

浅谈非损伤微测技术在植物营养方面的应用

高阳阳*

山东农业大学 园艺科学与工程学院, 山东 泰安 271018

摘要: 离子和分子的动态稳定与平衡是所有生命体的共同基本特征之一, 这种动态平衡依赖于各类生物膜两侧的离子和分子浓度梯度的维持。研究不同营养条件下植物细胞内离子和分子的动态对于解析植物吸收利用养分、解析其生理过程和分子机理有十分重要的意义。非损伤微测技术 (NMT) 可以通过检测离子和分子在跨膜运动时形成的浓度梯度, 来体现活体材料的基本生命特征和生理功能, 因此, 非损伤微测技术在生命科学领域尤其是对植物营养领域有着广泛的应用, 这一技术对作物营养高效利用新品种的培育重要的指导意义。

关键词: 植物营养; 非损伤微测技术 (NMT); 营养高效利用。

一、非损伤微测技术简介及在中国发展历程

植物对营养元素的吸收利用速率是反映植物有机物质积累的重要指标之一。而如何快速有效的研究植物对营养的吸收速率也是近年来科学家们的目标。非损伤微测技术 (Non-invasive Micro-test Technology, NMT) 的出现, 为研究活体植物吸收利用外界离子或分子开辟了一条快速有效的途径。NMT 是用来测量和研究生命体外微环境中离子或分子流的一种技术, 该技术利用选择性电极, 在保证被测样品完整性和近似实际生理环境状态下, 对进出样品的各种离子或分子流进行三维、实时、动态的测量, 从而获得离子或分子流的浓度、流速和运动方向信息 (宋雪皎等, 2017; Ammann, 1986; Kührtreiber and Jaffe, 1990)。NMT 可测样品的种类繁多, 范围较广, 包括单个细

胞、液泡、菌体, 以及组织、器官、个体等, 它通过实时测定活体组织或细胞与内 / 外环境间的离子或分子流动, 以此绘制相应离子或分子的内流或外排曲线, 揭示基因的功能及相关生理机制 (Kunkel et al., 2005)。目前的 NMT 系统可测定 $H^+/Ca^{2+}/Cd^{2+}/Mg^{2+}/Cl^-/Pb^{2+}/Cu^{2+}/Na^+/K^+/NO_3^-/NH_4^+/H_2O_2/O_2/H_2/IAA$ / 葡萄糖等多种离子或分子的实时转运变化情况, 常应用于生物医学、植物科学、微生物学、水产科学、环境科学等领域 (印莉萍等, 2006; 丁亚男和许越, 2007)。

NMT 是生命科学的基础核心技术, 最早起源于美国的伍兹霍尔海洋生物实验室 (MBL, UChicago) (相关资料信息来着中关村 NMT 产业联盟网站)。1974 年美国海

收稿日期: 2022-12-07

* 通讯作者 E-mail:gao_yang2010@163.com

编辑作者 E-mail: yanhan@nmtia.org.cn

洋生物学实验室 (MBL, Marine Biological Laboratory) 的神经科学家 Lionel F. Jaffe 提出原初概念, 1990 年成功应用于测定细胞的 Ca^{2+} 流速。2001 年, 中国学者许越先生与 Dr. Jaffe 在美国马萨诸塞州创立美国扬格公司 (YoungerUSA, LLC), 标志着现代 NMT 商业化的开端。2002-2005 年, 美国扬格公司的 NMT 技术开始服务于美国航空航天局的专业研究培训中心 (NASA Specialized Center of Research and Training, NSCORT), 参与植物重力研究的项目。2005 年起, 旭月 (北京) 科技有限公司在北京中关村正式成立, 并成为美国扬格公司的战略合作伙伴, 正式宣布将中国纳入世界 NMT 商业化版图, 2007 年, 美国扬格 (旭月北京) 非损伤技术中心成立, NMT 正式地服务于中国的科研人员。旭月公司成立后, 在与美国扬格公司的共同努力下, 顺利完成了 NMT 及系统的商业化, 并且在中国建立了完善的售后服务体系。随后又联手推出了在中国组装的非损伤微测系统, 推动了 NMT 在中国的应用和普及。经过十几年的努力以及对 NMT 的引进、本土化利用和再创新, 旭月公司获批的直接和相关技术专利已超过 20 项, 形成了较为完善的知识产权保护体系, 为 NMT 在中国的未来发展奠定了法律基础。依赖于以上的发展, 国内已有 27 个省、直辖市、自治区, 近 200 家高校院所的 300 多个实验室利用 NMT 进行科学研究。2015 年, 由旭月公司牵头的“中关村 NMT 产业联盟”成立, 致力于 NMT 的产业化发展, 目前已有数十家科研院校及企业加盟。

2022 年 10 月 20 日, 中关村 NMT 产业

联盟召开了高级研修班的线上培训工作, 中国科学院植物所匡廷云院士和旭月公司创始人许越先生主持了开幕式。会议期间, 北京旭月公司的高级工程师刘蕴琦详细介绍了 NMT 系统的工作原理及其在植物科学领域的应用, 巨肖宇工程师围绕流速云系统进行了详细的讲解和操作演示。NMT 技术目前可以支持检测约 15 种离子或分子, 其中 Na^+ / K^+ / NO_3^- / NH_4^+ 等与盐胁迫及养分吸收利用相关的指标应用尤其广泛。福建农林大学的许卫锋教授利用了 NMT 技术对植物的向水性及根鞘营养吸收方面进行了研究, 发现在垂直方向, 重力促进根系向水性, 帮助根系寻找垂直方向的水分; 在水平方向, 重力却降低根系向水性, 抑制根系寻找侧面方向的水分, 而且根系在晚上的侧面向水性能力要高于白天。进一步研究发现, 与照光比较, 黑暗降低了根尖淀粉合成关键基因 PGM1 的表达, 进而减少根尖淀粉积累, 由于根尖淀粉减少导致向重性减弱, 因此提高了侧面向水性 (Li *et al.*, 2020)。另外, 许教授的研究还发现生长素在水稻根鞘建成过程中发挥着重要作用 (Xu *et al.*, 2022)。以上这些研究对指导农作物节水灌溉、维持植物有效生长具有重要意义。除了水分, 植物根系吸收的养分也是维持植物正常生命活动不可或缺的关键因子。浙江农业科学院的阮丽教授在茶树养分吸收及耐贫瘠方面也有着深入的探究 (苏静静等, 2020)。通过 NMT 技术研究发现, 茶树作为一种喜 NH_4^+ 的植物, 其根表对 NH_4^+ 的吸收速率显著高于 NO_3^- , 而施加 NH_4^+ 和 NO_3^- 的混合氮源时, 则发现茶树对混合氮源的吸收速率明显高于任何一

种单一氮源。另外，研究还发现 NO_3^- 的存在会抑制 NH_4^+ 的吸收，而 NH_4^+ 的存在会促进 NO_3^- 的吸收。相对于之前的耗竭法和同位素标记法，NMT 技术对活体的检测能够长期动态监测同一株植物或同一个材料，更加科学严谨的说明问题。另外，中国农业科学院的王耀生教授也利用 NMT 技术验证了干旱胁迫下大麦叶片 ABA 增加调节保卫细胞排 K^+ 吸 Ca^{2+} 介导气孔关闭的运动机制 (Xing *et al.*, 2021)。对于我们科研工作者而言，实验材料（尤其是作物、果树等难以获得突变体或者转基因株系的物种）是十分珍贵的，以往破坏性取样和检测的手段不但浪费材料，很多时候由于对材料的物理性破坏，使得测定的数据并不准确。基于以上多位专家老师的报告，我们可以发现依托于 NMT 系统平台，越来越多的科研工作者可以获得活体材料实时动态的实验数据。这既是 NMT 技术创建的初衷，也是为我们科研工作者津津乐道的优势所在。

氮素是维持植物正常生长发育的重要营养元素之一，它是植物细胞中氨基酸、蛋白质、核酸和植物激素等重要组分的组成元素，同时它还参与到植物多种生理过程，氮也因此被称作生命元素 (孟庆伟等, 2017; Stitt, 1999)。除此之外，氮素也能够作为信号物质参与调控植物的生命过程。而研究植物如何吸收利用氮素并探寻其中的分子规律和调控机制，对于提高作物的氮素利用效率、实现作物的高产高效至关重要 (陈雅君等, 2013; Crawford and Glass, 1998)。NMT 技术在植物营养方面的应用也是越来越普遍，包括南京农业大学的徐国华、张雅丽团队，

湖南农业大学的张振华团队，中科院遗传与发育生物学研究所的童一平团队、中科院南京土壤研究所的施卫明团队在内的多家科研机构 and 团队都利用 NMT 技术研究了不同植物对氮素的吸收利用 (He *et al.*, 2015; Huang *et al.*, 2019; Jian *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2012;)。我在攻读博士期间主要从事植物营养分子生物学的研究，通过阐明植物吸收利用氮素（以 NO_3^- 为主）的机理，解析其分子调控网络，最终为实现氮素高效利用和培育高氮效作物新品种提供理论指导。我们在研究过程中，主要是对植物吸收利用 NO_3^- 的生理过程进行检测，包括利用我们学校的 NMT 系统，将在同一培养条件下生长的野生型和突变体进行根系 NO_3^- 转运的实时监测，从而确定突变体对外界 NO_3^- 的吸收是否发生变化；对不同 NO_3^- 浓度培养条件下的野生型和突变体进行根系 NO_3^- 转运的实时监测，以便确定目标基因发挥作用的 NO_3^- 浓度范围；另外，我们同样也对不同氮素形式 (NO_3^- 、 NH_4^+ 以及氮饥饿条件) 培养条件下的材料进行检测，来研究目的基因对不同氮素的响应。由于该部分实验相关数据暂未发表，很遗憾没有详细标明基因及突变体生物相关信息。

行文至此，再说几点我的个人想法和一点小小的建议。在我看来，NMT 系统是一个致力于服务科研人员的高效技术，它对于提高我们的科研效率和保证科学的准确性是毋庸置疑的，它在推动生命科学研究发展中的作用也是显而易见的。虽然我们学校平台购置了 NMT 系统，但是作为一个研究氮素营养的科研人员而言，我们对 NMT 的技术

掌握仍处于每次使用都需要寻找专业人员操作的尴尬局面。尤其是在我最初使用时，整个平台只有一个人可以熟练操作，这种寄希望于一个人的实验模式是影响技术应用的巨大阻碍。另外，基于对实验结果的科学和准确性负责，我们一般一批样品需要测定十几个小时甚至更长时间，而很多对物候期有要求的材料需要短时间内完成测定，这对我们农学专业的科研人员来说也是一个巨大的挑战。当然，由于这几年疫情的影响，我们没有办法直接利用 NMT 系统进行实验测定，我对 NMT 系统的了解也可能失去了时效性，因此，以上几点拙见也可不予考虑。请相信我们对 NMT 技术的认可，也希望中关村 NMT 产业联盟以后可以多多举办这样的研修班，让更多的科研人员可以了解和使用 NMT。

参考文献：

陈雅君, 闫庆伟, 张璐, 刘威, 刘慧民, 闫永庆. 2013, 氮素与植物生长相关研究进展. 东北农业大学学报, 44, 144-148.

丁亚男, 许越. 非损伤微测技术及其在生物医学研究中的应用. 物理, 2007(07):548-558.

非损伤微测技术简介 - 什么是 NMT. 中关村 NMT 产业联盟. http://www.nmtia.org.cn/index.php?option=com_content&view=article&id=452&Itemid=351

孟庆伟, 高辉远, 王玮, 王勇, 王衍安, 李刚, 杨兴洪, 张元湖, 张海森, 赵世杰, 徐瑛, 董新纯. 2017, 植物生理学, 中国农业出版社.

宋雪皎, 李岩, 张春庆. 非损伤微测技术及其应用. 分析仪器, 2017(02):78-83.

苏静静, 阮丽, 王丽鸳, 韦康, 吴立赞, 白培贤, 成浩. 茶树氮吸收效率的早期鉴定技术研究. 茶叶科学, 2020,40(05):576-587.

印莉萍, 上官宇, 许越. 自然科学进展, 2006,16(3):262.

Ammann D. Ion Selective Micro-electrodes. New York: Springer-Verlag, 1986.

Crawford N. M., Glass A. D. 1998. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. Trends Plant Sci., 3, 389-395.

He X, Qu B, Li W, Zhao X, Teng W, Ma W, Ren Y, Li B, Li Z, Tong Y. The Nitrate-Inducible NAC Transcription Factor TaNAC2-5A Controls Nitrate Response and Increases Wheat Yield. Plant Physiol. 2015 Nov;169(3):1991-2005.

Huang S, Liang Z, Chen S, Sun H, Fan X, Wang C, Xu G, Zhang Y. A Transcription Factor, OsMADS57, Regulates Long-Distance Nitrate Transport and Root Elongation. Plant Physiol. 2019 Jun;180(2):882-895.

Jian S, Liao Q, Song H, Liu Q, Lepo JE, Guan C, Zhang J, Ismail AM, Zhang Z. NRT1.1-Related NH_4^+ Toxicity Is Associated with a Disturbed Balance between NH_4^+ Uptake and Assimilation. Plant Physiol. 2018 Dec;178(4):1473-1488.

Kühtreiber W. N., Jaffe L. F.. Cell Biol., 1990,110:1565.

Kunkel J. G., Cordeiro S., Xu Y. Chapter Vin Plant Electro-physiology-Theory and Methods. Ed. Volkov A G. Berlin/Heidelberg :Springer-Verlag, 2005.109-137.

Li Q, Li BH, Kronzucker HJ, Shi WM. Root growth inhibition by NH_4^+ in Arabidopsis is mediated by the root tip and is linked to NH_4^+ efflux and GMPase activity. *Plant Cell Environ.* 2010 Sep;33(9):1529-42.

Li Y, Yuan W, Li L, Miao R, Dai H, Zhang J, Xu W. Light-Dark Modulates Root Hydrotropism Associated with Gravitropism by Involving Amyloplast Response in Arabidopsis. *Cell Rep.* 2020 Sep 29;32(13):108198.

Stitt M. 1999. Nitrate regulation of metabolism and growth. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2, 178-186.

Tang Z, Fan X, Li Q, Feng H, Miller AJ, Shen Q, Xu G. Knockdown of a rice stelar nitrate transporter alters long-distance translocation but not root influx. *Plant Physiol.* 2012 Dec;160(4):2052-63.

Xing L., Ma J., Liu H., Wang F., Yao S. In situ determination of guard cell ion flux underpins the mechanism of ABA-mediated stomatal closure in barley plants exposed to PEG-induced drought stress. *Environmental and experimental botany.* 2021.187.

Xu F, Liao H, Zhang Y, Yao M, Liu J, Sun L, Zhang X, Yang J, Wang K, Wang X, Ding Y, Liu C, Rensing C, Zhang J, Yeh K, Xu W. Coordination of root auxin with the fungus *Piriformospora indica* and bacterium *Bacillus cereus* enhances rice rhizosheath formation under soil drying. *ISME J.* 2022 Mar;16(3):801-811.

(责任编辑: 李雪霏)